Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg

ZUR EIGNUNG ARTSPEZIFISCHER UNTERSCHIEDE IM ELEKTROPHORETISCHEN MUSTER DER LAKTATDEHYDROGENASE UND DER MALATDEHYDROGENASE FÜR DIE RECHTSMEDIZINISCHE SPURENUNTERSUCHUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ULRIKE SCHEIDT
aus Marburg

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg

ZUR EIGNUNG ARTSPEZIFISCHER UNTERSCHIEDE IM ELEKTROPHORETISCHEN MUSTER DER LAKTATDEHYDROGENASE UND DER MALATDEHYDROGENASE FÜR DIE RECHTSMEDIZINISCHE SPURENUNTERSUCHUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ULRIKE SCHEIDT
aus Marburg

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 15.12.1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof.Dr.med. F. Neurath
Referent: Prof.Dr.med. I. Oepen
Korreferent: Prof.Dr.med. F. Schleyer

Inhalt Seite

1. Einleitung 1

1.1. Möglichkeiten und Grenzen der Blutartunterscheidung 1

1.2. Fragestellung 3

2. Laktatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) 5

2.1. Biochemie - Polymorphismus - Klinische Bedeutung - LDH-Befunde aus Tiergeweben ... 5

2.2. Eigene Versuche 15

2.2.1. Material und Methode 15

2.2.1.1. Material 15

2.2.1.2. Methode 16

2.2.1.2.1. Elektrophorese nach ASANO u. Mitarb. auf CA-Folien 17

2.2.1.2.2. Elektrophorese auf Temo-Folien .. 18

2.2.1.2.3. Färbung der LDH-Banden 19

2.2.1.2.4. Auswertung 21

2.2.2. Vorversuche 21

2.2.2.1. Anlegen der künstlichen Blutspuren 21

2.2.2.2. Aufbereiten der Blutspuren 22

2.2.2.3. Vergleich zwischen CA-Folie und Temo-Folie 24

2.2.2.4. Fehlerquellen 25

2.2.3. Hauptversuche und Ergebnisse 26

2.3. Besprechung der Befunde und Vergleich mit Literaturdaten 38

3. Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37) 50

3.1. Biochemie und Polymorphismus 50

3.2. Material und Methode 53

3.3. Versuche und Ergebnisse 54

3.4. Besprechung der Befunde 59

4. Zusammenfassung 63

5. Literatur 65

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546807_0013

1. EINLEITUNG

Die Blutart-Differenzierung ist ein wesentlicher Teil der rechtsmedizinischen Blutspuren-Diagnostik. Sie dient der Aufklärung von Gewalttaten und Unfallverläufen. Aber auch im Bereich der Magie, der Scharlatanerie und des Sakralbetruges kann es Anlässe geben, bei denen Blutspuren zu analysieren sind (LINCOLN). Dabei ist zunächst meistens die Frage zu beantworten, ob Menschenblut vorliegt. Bei negativem Ergebnis ist es in einigen Fällen von Interesse, die Herkunft einer Spur hinsichtlich der Spezies genauer zu ermitteln.

1.1. Möglichkeiten und Grenzen der Blutart-Unterscheidung

Als erste Methode zur spezifischen Artunterscheidung wurde der Präzipitintest im flüssigen Medium nach UHLENHUTH eingeführt. Er ergibt aber nur bei klaren Lösungen zuverlässige Ergebnisse und verbraucht viel Antiserum. Dieser Methode liegt das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde, ebenso wie dem Diffusionstest im Agargel nach OUCHTERLONY. Sein Nachteil liegt in der langen Reaktionszeit (12-18 h), während trübe Lösungen hier nicht stören. Der heute am ehesten zu empfehlende Anti-Human-Globulin-Hemmtest bietet die Vorteile der schnelleren Reaktion sowie der Anwendbarkeit bei trübem Serum oder Extrakt. Er soll aber beim Nachweis gealterter Blutspuren früher versagen als der Präzipitintest (GROBBELAAR u. Mitarb. 1).

Diese immunologischen Methoden können pro Bestimmung immer nur Auskunft hinsichtlich derjenigen Spezies geben, für die ein spezifisches Antiserum verwendet wurde. Dadurch ist nur eine Aussage darüber möglich, ob Menschenblut oder das bestimmte Tierblut vorliegt oder nicht. Dagegen ergeben sich keine Hinweise auf andere vom Antiserum nicht erfaßte Spezies. Die Grenzen dieser Methode sind in feuchtem Milieu (tropisches Klima) besonders früh erreicht. So beobachteten MADIWALE und MAHAL (1969 u. 1970) in Indien falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse. Sie werden durch Mikrobenwachstum erklärt, das auf die spezifischen Proteinstrukturen einwirkt und so den Artnachweis beeinträchtigt. Andere Fehlerquellen sind unspezifische Präzipitationen von Blutextrakten durch Serumproteine; sie werden von HARTMANN und OEPEN beschrieben, während BAUER über heterologe Reaktionen von Säugetierseren mit monospezifischen Antihumanseren berichtete.

Bei Verwendung spezifischer Antiseren gegen tierische Proteine können außerdem Verwandtschafts-Reaktionen bei folgenden Konstellationen auftreten: Hammel-Ziege, Hausschwein-Wildschwein, Reh-Hirsch und Mensch-Schimpanse. Diese Spezies-Paare reagieren gleichartig und können immunologisch nicht unterschieden werden.

Eine andere Möglichkeit der Artunterscheidung an Blutspuren ist die Darstellung von Enzym-Mustern mit Hilfe der Elektrophorese. RAABE beschrieb das Esterase-Muster an

Blutspuren von 9 bei uns heimischen Tierarten. MADIWALE u. Mitarb. (1972, 1.u.2) untersuchten einige Jahre später Blutspuren 5 verschiedener Tierarten hinsichtlich ihrer Laktatdehydrogenase (LDH)-, Malatdehydrogenase (MDH)- und Peroxydase-Isoenzymbanden mittels der Elektrophorese in Polyacrylamid-Gel. Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, daß die Isoenzyme der LDH und MDH aus verschiedenen Körpergeweben verschiedener Säugetiere bei der elektrophoretischen Auftrennung spezifische Bandenmuster ergeben. So ist es z.B. möglich, Fische und Vögel anhand ihres Gewebe-LDH-Musters zu identifizieren (KOWALEWSKI, 1972 u.1975). (Eine ausführliche Übersicht über Möglichkeiten der Blutart-Unterscheidung mit Angaben zur Methodik sowie zu Fehlerquellen siehe bei SCHLEYER und OEPEN.)

1.2. Fragestellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Untersuchungen von MADIWALE u. Mitarb. (1972, 1.u.2), die - gezwungen durch die in Indien herrschenden klimatischen Einflüsse - einen neuen Weg für den Artnachweis an Blutspuren suchten. Sie analysierten die Isoenzyme der LDH, MDH und der Peroxydase bei folgenden Tierarten: Kaninchen, Schaf, Ziege, Ochse und Büffel.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, inwieweit sich dieses Verfahren auch zur forensischen Blutart-Unterscheidung der in unseren Breiten lebenden Tiere

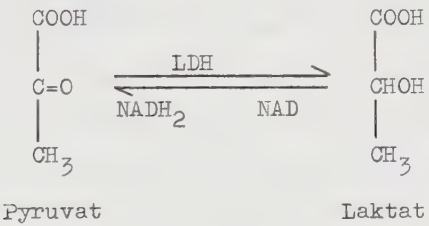
eignet. In die Untersuchung werden die Isoenzyme der LDH und der MDH einbezogen, die bei den in der Literatur schon beschriebenen Befunden eine gute Differenzierung gestatten. Daher wird auf die Darstellung der Peroxydase-Muster verzichtet.

2. LAKTATDEHYDROGENASE (EC 1.1.1.27)

2.1. Biochemie - Polymorphismus - Klinische Bedeutung - LDH-Befunde aus Tiergeweben

2.1.1. Biochemie

Die LDH ist ein Enzym des Glykolyse-Zyklus und katalysiert reversibel als Oxydoreduktase die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat mit Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) als Coenzym.



Pyruvat Laktat

Nach MARKERT ist es die - wahrscheinlich fundamentale - Funktion der LDH, den NAD/$NADH_2$-Quotienten zu regulieren, der für zahlreiche biochemische Funktionen in der Zelle von großer Bedeutung ist.

Chemisch stellt die LDH keinen einheitlichen Proteinkörper dar. Sie besteht aus 5 Tetrameren, die sich aus 2 differenten Untereinheiten nach dem Gesetz der freien Kombination zusammensetzen. Die 5 Tetramere oder Isoenzyme stellen sich entsprechend ihrer unterschiedlichen Aminosäuren-Zusammensetzung im elektrischen Feld an verschiedenen Orten dar und werden nach ihrer Wanderungs-Geschwindigkeit benannt: die am schnellsten anodenwärts

wandernde Bande ist die LDH-1, die langsamste die LDH-5. Dazwischen liegen LDH-2, LDH-3 und LDH-4. Die Isoenzyme LDH-1 und LDH-5 sind homogen, die übrigen Isoenzyme sind hybride Formen. Die beiden Monomere werden als M-(oder A-)Kette und H-(oder B-)Kette bezeichnet. Diese Nomenklatur wurde gewählt, weil die LDH-1 (H_4-Typ) hauptsächlich im Herzmuskel, die LDH-5 (M_4-Typ) überwiegend im Skelettmuskel vorkommt.

Tabelle 1 soll das nochmals verdeutlichen:

Tetramere			Isoenzym	
BBBB	(B_4)	oder H_4	LDH-1	(-)
ABBB	($A B_3$)	oder H_3M	LDH-2	
AABB	(A_2B_2)	oder H_2M_2	LDH-3	
AAAB	(A_3B)	oder $H M_3$	LDH-4	(+)
AAAA	(A_4)	oder M_4	LDH-5	

Tab.1: Schematische Darstellung der Polypeptidkomposition der 5 LDH-Isoenzyme (nach KOWALEWSKI 1972)

Bei Säugetieren sowie bei Menschen und Vögeln findet man in Spermatozoen und im postpuberalen Testisgewebe eine zusätzliche LDH-Bande. Diese sonst in keinem Organ und keiner Körperflüssigkeit vorkommende Isoenzymbande wurde von den Erstbeschreibern BLANCO und ZINKHAM als LDH-X bezeichnet. Sie stellt sich zwischen den Banden LDH-3 und LDH-4 dar. Somit werden die LDH-Untereinheiten mit großer Wahrscheinlichkeit von drei verschiedenen Genloci gesteuert.

Die Isoenzym-Untereinheiten A und B werden in Zellen verschiedener Organe in unterschiedlichem Ausmaß synthetisiert, so daß organcharakteristische Isoenzym-Muster resultieren. Danach lassen sich Gewebe in drei große Gruppen unterteilen:

1. hauptsächlich H(B) / LDH-1 und LDH-2 enthalten:
   Herzmuskel, Niere, Erythrozyten, Gehirn;
2. hauptsächlich die hybriden Formen LDH-2 bis LDH-4 enthalten:
   Lunge, Milz, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere, Ösophagus, Pankreas, Ovar, Hoden, Uterus, Blasenwand, Ureter, Tonsillen, Lymphknoten, Thymus;
3. hauptsächlich M(A) / LDH-5 enthalten:
   Leber, Skelettmuskel, Epidermis.

Eine Organspezifität im strengen Sinne gibt es jedoch nicht, außer beim postpuberalen Testisgewebe und den Spermatozoen durch die LDH-X.

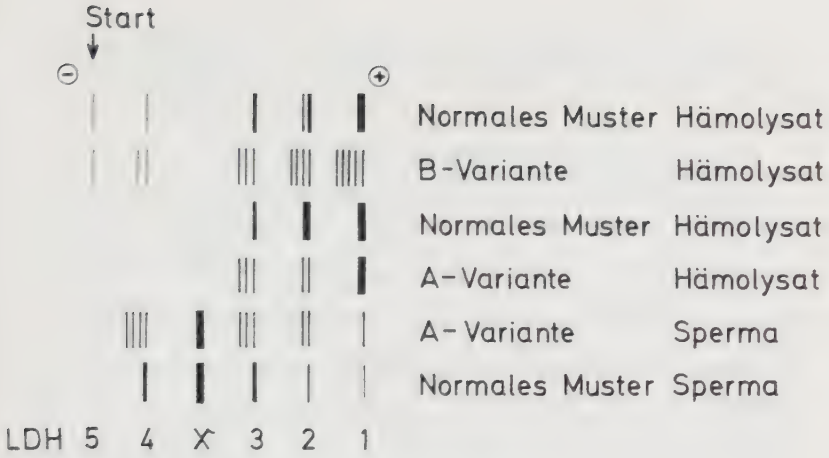
Die Gewebe, in denen hauptsächlich die H-Untereinheiten gefunden werden, zeigen einen hohen O_2-Verbrauch. Die M-Untereinheiten finden sich dagegen eher in Zellen mit vorwiegend anaerobem Stoffwechsel. Die beiden homogenen Isoenzyme LDH-1 und LDH-5 zeigen eine unterschiedliche Substrathemmung: während die LDH-1 mit zunehmender Pyruvat-Konzentration gehemmt wird, tritt erst bei sehr hohen Substrat-Konzentrationen eine Hemmung der LDH-5

ein. Dieses unterschiedliche Verhalten wurde dahingehend gedeutet, daß Gewebe mit hohem LDH-1-Gehalt eine Pyruvatansammlung zugunsten des oxydativen Pyruvatabbaues über den Krebszyklus tolerieren, während Gewebe mit hauptsächlich LDH-5 die Umwandlung Pyruvat-Laktat begünstigen (KOWALEWSKI, 1972 u.1975). Die Halbwertzeiten der 5 Isoenzyme sind nicht gleich. Sie betragen für die langsam wandernde LDH-5 10±2 h, für die LDH-1 113±60 h (KOWALEWSKI, 1972, SCHMIDT u. Mitarb.).

2.1.2. Polymorphismus

BOYER u. Mitarb. beschrieben 1963 erstmals einen Polymorphismus der LDH (B-Variante). DAVIDSON u. Mitarb. fanden 1965 eine Variante der A-Untereinheit in Erythrozyten. Die Varianten können durch Mutation sowohl der M-(oder A-) als auch der H-(oder B-) Untereinheiten zustande kommen. Bei Heterozygotie für ein Cistron (a oder b) sind bei uneingeschränkter Polymerisation demnach 15 verschiedene Isoenzym-Moleküle möglich. Bei einem Polymorphismus der A-Untereinheiten nimmt die Zahl der Banden von LDH-1 nach LDH-5 zu, während die Varianten der B-Untereinheiten zusätzliche Banden vor allem im Bereich der LDH-1 aufweisen (Abb.1) (BOYER u. Mitarb.; MOURANT u. Mitarb.; KOWALEWSKI, 1972 u.1975).

Die Frequenz der Varianten ist besonders in der weißen Bevölkerung mit etwa 0,3 % zu niedrig, als daß die LDH



Nach BOYER 1963 DAVIDSON u.Mitarb. 1965

Abb.1 LDH-Muster aus Hämolysat und Sperma schematisch nach BOYER (B-Variante) und DAVIDSON u. Mitarb. (A-Variante)

für Abstammungs- oder Identifizierungs-Untersuchungen genutzt werden könnte. Bei Schwarzen werden Sondertypen mit etwa 1 % zwar etwas häufiger beobachtet (NILSSON u. ERIKSSON, KOWALEWSKI, 1972 u.1975), dennoch wird man nur in extrem seltenen Fällen durch ein besonderes LDH-Muster brauchbare Hinweise gewinnen können. Um eine solche Möglichkeit dann aber wahrnehmen zu können, ist es wichtig zu wissen, daß Varianten nicht nur in Erythrozyten, sondern auch im Sperma (A-Variante, DAVIDSON u. Mitarb.) und im Speichel (LDH-Defizienz, KITAMURA u. Mitarb.) nachzuweisen sind. Auch bei einer großen Zahl

von Tierspezies konnten Mutationen der LDH beobachtet werden (KOWALEWSKI, 1975).

2.1.3. Klinische Bedeutung

Da die LDH normalerweise im Intrazellularraum vorkommt, wird sie erst bei Zellschädigung oder -untergang frei und tritt ins Serum über. Ein Anstieg der Gesamt-LDH ist wenig spezifisch. Schon durch falsche Technik bei der Blutentnahme können die Werte durch Hämolyse der Erythrozyten verfälscht werden, die 150mal mehr LDH enthalten als Serum (ISSELSTEIN). Sehr hohe Gesamt-LDH-Werte finden sich bei unbehandelten megaloblastären Anämien. Ähnlich hohe Werte über 1200 U/l finden sich nur noch bei akuter Leberzellnekrose und ausgedehnter Lebermetastasierung. Eine Übersicht über einige Erkrankungen, die mit einer LDH-Erhöhung im Serum einhergehen, gibt Tabelle 2.

Für die klinische Diagnostik und Differential-Diagnostik hat vor allem die Isoenzym-Bestimmung Bedeutung, und dabei wiederum die Bestimmung der α-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (α-HBDH), die den Isoenzymen LDH-1 und LDH-2 entspricht.

Beim Myokardinfarkt, vor allem beim klinisch stummen und dem ohne EKG-Veränderungen, hat eine LDH-Erhöhung und der Anstieg der α-HBDH große Aussagekraft. Der Quotient LDH/α-HBDH ist hierbei erniedrigt.

Tab.2 Krankheiten, die mit einer Erhöhung der LDH einhergehen

1. Blutkrankheiten (LDH-1 und LDH-2)
   - -unbehandelte Perniziosa, Abfall unter Therapie
   - -hämolytische Anämien
   - -akute Leukosen
   - -chronisch-myeloische Leukämie
   - -Mononukleose
2. Lungenerkrankungen (LDH-3)
   - -Lungenembolie mit Infarkt
   - -Bronchialkarzinom
3. Herzerkrankungen (LDH-1)
   - -Herzinfarkt
   - -Leberstauung infolge Herzerkrankung (LDH-5)
   - -Myokarditis
4. Leber- und Gallenwegserkrankungen (vor allem LDH-5)
   - -Hepatitis
   - -Zirrhose (akute Schübe)
   - -Leberzell-Karzinom
   - -toxische Leberschädigung
5. Maligne Tumoren
6. Myopathien

Bei Lebererkrankungen ist die Aktivität der LDH wechselhaft und meistens nicht stark erhöht. Der Quotient LDH/α-HBDH ist meistens nach oben hin verschoben. In der Leberdiagnostik hat die Isoenzym-Bestimmung vor allem Aussagekraft bei der Differenzierung einer hämolytischen Komponente (LDH-1) eines gleichzeitig bestehenden hepatischen Ikterus und als Suchtest bei der Diagnose eines primären Leberzell-Karzinoms in einer Zirrhoseleber. Beim Niereninfarkt ist eine stark erhöhte Gesamt-LDH bei stark erniedrigtem LDH/α-HBDH-Quotienten der wichtigste biochemische Parameter. Patienten mit progressiver Muskeldystrophie vom Typ Duchenne und deren nicht erkrankte Familienmitglieder zeigen ein aussergewöhnliches Skelettmuskel-Isoenzymmuster. Während der normale Skelettmuskel hohe LDH-5-Werte aufweist, findet man dort hauptsächlich LDH-1 bis LDH-3. Für die Diagnostik erhält man mit einer Muskelbiopsie und der Serum-LDH zusammen spezifische Ergebnisse (EISENBURG u. Mitarb.; ISSELSTEIN, KOWALEWSKI, 1972).

2.1.4. LDH-Befunde aus Tiergeweben

Die LDH wird in allen Zellen von Wirbeltieren und vielen Wirbellosen gefunden (MARKERT u. URSPRUNG). NEILANDS trennte 1952 Rinderherz-LDH mit der Tiselius-Technik in zwei Proteinfraktionen. 1957 konnten WIELAND und PFLEIDERER mit Hilfe der Membranfolien-Hochspannungs-Elektrophorese in verschiedenen Gewebehomogenaten der Ratte

5 bis 6 Fraktionen mit LDH-Aktivität trennen. Im selben Jahr isolierten PFLEIDERER und JECKEL aus Herz- und Skelettmuskel verschiedener Tierarten LDH-Präparate.
SAYRE und HILL sowie VESELL und BEARN wiesen erstmals 1957 drei verschiedene LDH-Fraktionen im menschlichen Serum mit der Papier- bzw. Stärkegelelektrophorese nach. Es folgten zahlreiche Arbeiten und Veröffentlichungen über LDH-Isoenzym-Muster in Geweben verschiedener Tierspezies und über Phylogenese und Ontogenese der LDH-Enzyme. Eine Übersicht mit weiteren Literaturangaben findet sich bei KOWALEWSKI (1975).

Bei aller, wegen der bei der Untersuchung der verschiedenen Tierarten angewandten Vielfalt der Trennverfahren, gebotenen Vorsicht, lassen sich die Befunde dahingehend interpretieren, daß zwischen den LDH-Mustern identischer Organe von Spezies zu Spezies charakteristische Unterschiede gefunden werden. Dabei sind sich die Muster je nach Verwandtschaftsgrad der Tierarten mehr oder weniger ähnlich (KOWALEWSKI, 1972 u.1975).
Während der Phylogenese sind drei Phänomene zu beobachten:
-die Isoenzym-Banden nehmen zu
-die anodischen Banden treten erst bei Säugern auf
-die anodischen LDH-Fraktionen nehmen im Verlauf der Phylogenese zu (KOWALEWSKI, 1975).

Nach MARKERT und URSPRUNG sollen fünf LDH-Isoenzyme in fast allen Geweben fast aller Säugetiere und Vögel gefunden werden.

2.2. Eigene Versuche

2.2.1. Material und Methode

2.2.1.1. Material

Untersucht wurden 15 Menschen- und insgesamt 127 Tierblutproben verschiedener Spezies. Folgende Arten wurden in die Studie einbezogen: Ziege, Hammel, Pferd, Maus, Ratte, Ente. Huhn, Gans, Fasan, Taube, Krähe, Hund, Katze, Schwein, Wildschwein, Rind, Reh, Hirsch, Hase, Wildkaninchen, Hauskaninchen und Fuchs.

Das Blut wurde entsprechend den Bedingungen in der Praxis nach der Entnahme beim Menschen bzw. der Schlachtung oder Erschießung bei Tieren auf Leinen-, Woll-, Baumwoll- oder Nylonläppchen aufgetropft und anschließend bei Zimmertemperatur getrocknet. Für die Alterungsversuche wurden die Blutspuren offen bei 18-22°C im Laboratorium gelagert.

Zur Untersuchung wurde das Material in folgender Weise aufbereitet:

12, besser 24 h vor der Elektrophorese wurden die Blutspuren in Aqua dest. gelöst und bis zur Untersuchung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Menge des für eine Untersuchung benötigten Spurensubstrates war nicht bei allen Tierarten gleich.

Normalerweise wurde eine Lösung angesetzt, deren Verdünnung - bezogen auf die Frischblutmenge - 1+8 betrug:

2 bzw. 4 mm^2 Spurenstoff (Baumwolle oder Leinen)
in 0,005 bzw. 0,01 ml Aqua dest. gelöst.

Bei folgenden Tierarten war weniger Spurenstoff nötig: Maus, Ratte, Fasan, Taube, Krähe, Reh, Hirsch, Hase, Wildkaninchen

1 bzw. 2mm^2 Spurenstoff (Baumwolle oder Leinen)
in 0,005 bzw. 0,01 ml Aqua dest. gelöst.

Das entsprach einer Verdünnung der zugrundeliegenden Frischblutmenge von 1+16.

2.2.1.2. Methode

Die Isoenzyme der LDH wurden elektrophoretisch sowohl auf Celluloseacetat (CA)-Folien (Biotest) als auch auf Temo-Folien (Molter) aufgetrennt, und anschließend durch Anfärbung sichtbar gemacht. Für die Auftrennung und Darstellung der Enzymbande auf der Temo-Folie wurden die hierfür von der Firma Molter angebotenen gebrauchsfertigen Lösungen verwandt. Bei der Elektrophorese und Färbung auf CA-Folien (Biotest) wurde die von ASANO beschriebene Methode übernommen. Die Elektrophorese-Vorrichtung der Firma Biotest ist ausführlich bei STAFUNSKY beschrieben.

2.2.1.2.1. Elektrophorese nach ASANO u. Mitarb. auf CA-Folien

1. Herstellung des Brückenpuffers 0,05 N Na-Veronal-puffer (pH 8,6):

10,31 g Barbital-Natrium

in etwa 400 ml Aqua dest. lösen

10 ml 1 N HCl zur Einstellung auf pH 8,6

Aqua dest. ad 1000 ml

2. Versuchsanordnung

a) Beschriften der Folien mit einem Kugelschreiber und für 10 min in Brückenpuffer einweichen. Dabei ist darauf zu achten, daß sich nicht durch zu schnelles und ungleichmäßiges Eintauchen Lufteinschlüsse in der Folie bilden, die das Ergebnis verfälschen können. Danach vorsichtige, oberflächliche Entfernung des überschüssigen Puffers von der Folie zwischen zwei Filterpapieren.

b) Beimpfen der Folien

Pro Elektrophoreselauf können 2 Folien mit je 8 Proben beimpft werden. Zur Standardisierung werden mit der Eppendorf-Pipette 0,005 bzw. 0,01 ml Spurenextrakt je Probe abpipettiert, und mit einem Kämmchen auf der kathodischen Seite der Folien aufgebracht.

c) Die beiden Kammern des Elektrophorese-Gerätes werden mit je 250 ml Brückenpuffer gefüllt und die Folien werden eingelegt.

d) Die angelegte Spannung beträgt 200 V bei einer Stromstärke von 1 mA/cm (=15 mA). Da die Spannung von 200 V konstant gehalten wird, muß ein allmähliches Absinken der Stromstärke in Kauf genommen werden.

e) Die Laufzeit beträgt bei Zimmertemperatur 60 min.

2.2.1.2.2. Elektrophorese auf Temo-Folien

Im wesentlichen ist hier der Arbeitsablauf ebenso, wie für die CAF-Elektrophorese beschrieben. Kammer- und Aktivatorpuffer sind hier zwei unterschiedliche Reagenzien, die vor Gebrauch im jeweils angegebenen Verhältnis mit Aqua dest. verdünnt werden. Die angelegte Spannung beträgt 350 V bei einer Stromstärke von 12 - 15 mA. Die Elektrophorese dauert 15 min bei Zimmertemperatur. In Abbildung 2 ist das Elektrophoresesystem schematisch dargestellt.

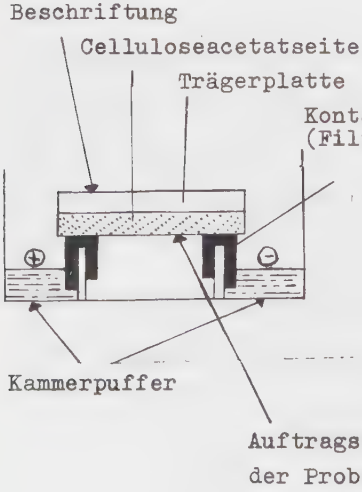


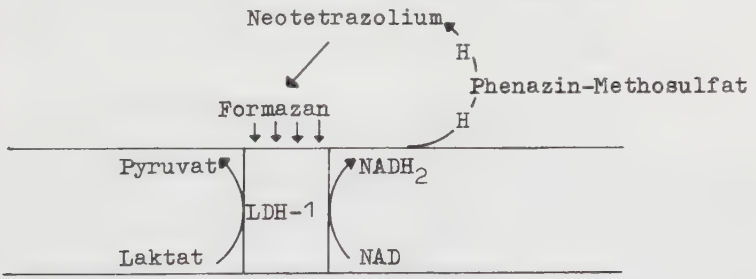
Abb.2 Vorrichtung für die elektrophoretische Auftrennung auf Temo-Folien (Fa. Molter)

2.2.1.2.3. Färbung der LDH-Banden

1. CA-Folie

a) Prinzip der Färbung

Die LDH katalysiert die Reaktion von Laktat zu Pyruvat bei Anwesenheit von NAD als Coenzym. Wird diese Reaktion mit Hilfe von Phenazin-Methosulfat an eine Farbreaktion gekoppelt, so erscheint an Stellen der Enzymaktivität eine tiefblau-violette Färbung.



b) Reagenzien: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
HCl
Na-Laktat
Phenazin-Methosulfat (PMS)
Nikotinamid-adenin-dinucleotid (NAD)
Nitroblau tetrazolium (3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylylen)-bis 2-(4-nitro-phenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium (NBT)

c) Herstellung des Färbepuffers 0,05 N TRIS-HCl-Puffer (pH 7,4):

3,028 g TRIS
in etwa 300 ml Aqua dest. lösen
21 ml 1 N HCl zur Einstellung auf pH 7,4
Aqua dest. ad 500 ml

d) Herstellung der Färbelösung

4 ml 2 M Na-Laktat
5 ml PMS (20 mg/100 ml)
40 mg NAD
30 mg NBT
in 56 ml Färbepuffer lösen

e) Die Folien werden in dieser Lösung für 30 min im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Nach dem Herausnehmen werden sie kurz mit Aqua dest. überspült, um eine Blaufärbung der ganzen Folie zu verhindern, und die Muster werden sofort abgelesen.

2. Temo-Folie

Auch hierbei werden wie bei der Elektrophorese die von der Firma Molter angebotenen gebrauchsfertigen Lösungen verwandt.

Arbeitsweise mit der Sandwich-Technik:

a) Bei Beginn der Elektrophorese eine weitere Temo-Folie = Entwicklerfolie in Aktivatorpuffer einlegen.

b) Nach 5 min Folie herausnehmen und die Celluloseacetat-Seite mit 1 ml der Färbelösung beschichten.

c) Elektrophorese-Folie nach Ablauf der Elektrophorese-Zeit aus der Kammer nehmen, zwischen zwei Filterpapierstreifen trocknen und so auf die mit Reagens beladene Entwicklerfolie legen, daß Celluloseacetat auf Celluloseacetat zu liegen kommt. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Luftblasen eingeschlossen werden.

d) "Sandwich" jetzt 30 min lang im Wärmeschrank bei 37°C inkubieren und das Muster sofort ablesen.

2.2.1.2.4. Auswertung

Um die Laufstrecke der einzelnen Banden möglichst genau bestimmen zu können, werden die Folien noch feucht auf eine 100 cm^2 große Glasblatte gelegt, auf die mit wasserfester Tusche ein Gitter mit Grundmaß 0,5 cm gezeichnet wurde. Im Gegenlicht schimmert der Raster durch und ermöglicht so eine gute Lagebestimmung der Banden.

2.2.2. Vorversuche

2.2.2.1. Anlegen der künstlichen Blutspuren

Die Tierblute mußten oft über weite Strecken transportiert werden, bevor sie im Laboratorium behandelt werden konnten. So schien es uns zunächst einfacher, das Blut bei der Schlachtung in einem Glasgefäß aufzufangen. Da wir unsere Bedingungen möglichst denen in der Praxis angleichen wollten, wurden keine gerinnungshemmenden Zu-

sätze verwandt, was zur Folge hatte, daß das Blut schon vor der Verarbeitung geronnen war. Es zeigte sich aber, daß die erst nachträglich auf Stoff aufgebrachten Blute, soweit es sich nur um Serum handelte, sehr schwache und zum Teil auch andere Muster zeigten als Vollblut. Dies konnte man zwar umgehen, indem auch von dem Blutkuchen auf Lappen gestrichen und getrocknet wurde, dann war aber die Standardisierung der Spurenmenge schwierig.

Aus diesen Gründen, und vor allem, um den Bedingungen in der Praxis nahezukommen, wurden alle weiteren Blute sofort bei der Schlachtung oder Erschießung des jeweiligen Tieres direkt auf einen Leinen- oder Baumwollappen aufgetropft, und - nach dem Transport in einer Plastikdose - sofort bei Zimmertemperatur offen im Raum getrocknet.

2.2.2.2. Aufbereitung der Blutspuren

Die Extrakte wurden so hergestellt, daß eine bestimmte Menge einer Blutspur in einem Reagensglas mit Aqua dest. angesetzt wurde. Dabei bereitete es Schwierigkeiten, die für das Ergebnis günstigste Spurenmenge festzustellen. Anfangs wurden von jeder Tierblutprobe 2 cm^2 große Stoffstücke in 0,5 ml Aqua dest. angesetzt (entspricht einer Verdünnung der Frischblutmenge von 1+8). Bei den meisten "Haustieren" ließen sich mit dieser Verdünnung die Isoenzym-Bande gut darstellen.

Bei folgenden Tieren stellten sich keine ablesbaren Einzelbanden, sondern große, breite, tief angefärbte Berei-

che dar, die sich sogar auf die übrigen Spuren auf der Folie ausdehnten und deren Muster unkenntlich machen konnten: Maus, Ratte, Fasan, Taube, Krähe, Reh, Hirsch, Hase und Wildkaninchen. Bei diesen Tieren mußte die Verdünnung auf 1+16 erhöht werden, um verwertbare Ergebnisse zu erhalten: 1 cm^2 Spurenstoff wurden in 0,5 ml Aqua dest. gelöst.

Diese Stoffmenge von 1 bzw. 2 cm^2 galt sowohl für Spuren auf Baumwolle als auch auf Leinen. Von synthetischen Stoffen (Nylon) brauchte man etwa das Doppelte an Stoffmenge, von Wolle die Hälfte. Diese beiden letztgenannten Textilien wurden aber nur selten als Spurenträger benutzt, weil es meistens schwierig war, von einem Tier genügend Blut zu bekommen, um es auf allen Stoffarten untersuchen zu können.

Alterung hatte auf die benötigte Spurenmenge keinen Einfluß. Der Verlust von Banden ließ sich durch Konzentrierung der Extrakte nicht kompensieren.

Bei Beginn der Versuche wurden die jeweiligen Proben 30 min vor Elektrophorese-Beginn angesetzt. Diese Zeit erwies sich als zu kurz:

1. bei einem Spurenalter von etwa 7 Tagen und mehr;
2. bei folgenden Tieren: Ziege, Hammel, Pferd, Huhn, Katze und Hund.

Im weiteren wurden alle Blutspuren mindestens 12 h vor der Elektrophorese mit Aqua dest. angesetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.2.2.1. Herstellung der Spuren-Extrakte mit 40%iger Saccharoselösung

MOKASHI und MADIWALE (1976) benutzten bei einigen Untersuchungen Saccharoselösung statt Aqua dest. als Lösungsmittel. Wir versuchten dies bei 29 Proben und erhielten bei frischen Spuren lediglich die gleiche Ergebnisqualität wie bisher. Bei gealterten Spuren waren die Ergebnisse mit Saccharose durch verbreiterte und verwischte Bandenmuster eher schlechter. Daher wurde dieses Verfahren nicht beibehalten.

2.2.2.3. Vergleich zwischen CA-Folie und Temo-Folie

Die Technik der Elektrophorese und Färbung bereitete auf keiner der beiden Folien Schwierigkeiten. Anfangs wurde versucht, die Temo-Folie mit den gleichen Reagenzien zu entwickeln, wie die CA-Folien, was aber nicht zu guten Ergebnissen führte. Deshalb wurden dann die von der Firma Molter eigens für diese Folie angebotenen gebrauchsfertigen Lösungen verwandt.

Die Elektrophoresezeit für die Temo-Folien mußte etwas verlängert werden, und zwar von den angegebenen 8 min auf 15 min bei 350 V, wodurch eine optimale Auftrennung der Tierblutbanden erreicht wurde. Trotzdem war die Elektrophoresedauer damit noch wesentlich kürzer als auf der CA-Folie, die 60 min benötigt.

Da die Technik mit der CA-Folie gute Ergebnisse brachte

und leicht zu handhaben war, wurde hauptsächlich mit dieser Folie gearbeitet. Auch brachte die längere Elektrophoresezeit eine geringere Störanfälligkeit für diejenigen Tierblutproben mit sich, die nur eine einzige LDH-Bande aufweisen. Wie aus Abb.5 hervorgeht, unterscheiden sich einige Tierarten mit Ein-Banden-Muster nur sehr wenig voneinander. Allerdings konnten mit der Sandwich-Technik auf Temo-Folien auch bei stark gealterten Spuren noch gute Ergebnisse erzielt werden.

2.2.2.4. Fehlerquellen

War die Zeit zwischen dem Ansetzen der Probe und ihrer elektrophoretischen Auftrennung zu kurz, so stellte sich das Isoenzym-Muster gar nicht oder nur unvollständig dar. Bei den Tieren, die nur eine LDH-Bande zeigten, war es besonders wichtig, Kammer und Färbepuffer-pH konstant zu halten, und die Elektrophorese-Zeit genau einzuhalten, um reproduzierbare und identifizierbare Ergebnisse zu erhalten, weil die LDH-Banden sich in einigen Fällen nur gering unterscheiden.

Ferner war es wichtig, auf jeder Folie eine Menschenblutprobe mitlaufen zu lassen und bei der Auswertung die Laufstrecke der Tierblut-Banden nicht auf den Startpunkt, sondern auf das Menschenblutmuster zu beziehen. Es zeigte sich nämlich, daß die Spuren unterschiedlich weit liefen, abhängig vom jeweiligen pH-Wert der Pufferlösung, von der angelegten Spannung, aber auch abhängig von der

Lage der Folie im Elektrophorese-Gerät. Auf der Folie, die den Kabelanschlüssen der Kammer näher lag, liefen die Spuren in 60 min etwa 2 mm weiter als auf der weiter entfernten.

2.2.3. Hauptversuche und Ergebnisse

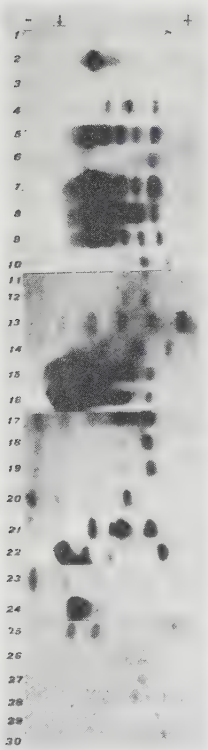
Während der Vorversuche war es gelungen, für die in ihrer LDH-Aktivität sehr unterschiedlichen Tierblute die jeweils günstigste Verdünnung zu ermitteln, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Anhand des Färbeverhaltens ließen sich die Blutproben in drei Gruppen unterteilen (bei Verdünnung 1+8):

a) Ziege,Hammel,Pferd Huhn,Katze,Hund	LDH-Banden allgemein nur sehr schwach darstellbar
b) Mensch,Ente,Gans, (Wild-)Schwein,Rind, Hauskaninchen,Fuchs	LDH-Banden stellten sich in ihrer Intensität etwa gleichstark wie Menschenblut dar
c) Maus,Ratte,Fasan,Taube, Krähe,Reh,Hirsch,Hase, Wildkaninchen	sehr starke Intensität, dadurch oft keine Einzelbanden identifizierbar.

Die Isoenzym-Muster der Blutproben wurden über einen Zeitraum von 20 Wochen beobachtet. Auch bei der Probenalterung konnte in vielen Fällen die obige Gruppeneinteilung bestätigt werden. Die LDH-Banden waren bei Gruppe c auffallend länger nachweisbar als bei Gruppe a.

In der folgenden Aufstellung wurde zur Definierung der Lage der einzelnen Isoenzymbanden nach der Färbung die LDH-1 des Menschblutes als Bezugsgröße gewählt (Abb.3 und Abb.5).



1 Huhn
2 Gans (frische Spur)
3 Gans (alte Spur)
4 M e n s c h
5 Wildkaninchen
6 Hauskaninchen (alte Spur)
7-8 Wildkaninchen
9 Feldhase
10 M e n s c h
11-12 Rind (alte Spur)
13 Schwein
14 M e n s c h
15 Reh
16 Hirsch
17-19 Hund
20 Katze
21 M e n s c h
22 Wildschwein
23 M e n s c h (Menstruationsblut)
24 Fasan
25 Schwein (alte Spur)
26 Rind (frische Spur)
27 Rind (alte Spur)
28 M e n s c h
29 Pferd
30 Hund (alte Spur)

Abb.3 LDH-Muster aus Blutspuren in der CAF-Elektrophorese
Pfeil: Startpunkt

Folgende Symbole werden verwendet:

A = die Tierblutbanden liegen anodenwärts der LDH-1

K = die Tierblutbanden liegen kathodenwärts der LDH-1

Die Zahl hinter der Bezeichnung der Tierart gibt die Anzahl der jeweils untersuchten Einzeltiere an. Die Tierarten sind in der Reihenfolge aufgeführt, wie sie in Abb.5 erscheinen.

ZIEGE (5)

eine Bande: 6 mm K/1 mm breit

Die Ziege gehört wie die beiden folgenden Tiere der Gruppe a an, deren Banden sich nur sehr schwach darstellten. Diese Bande war eine Woche lang bei allen untersuchten Proben nachweisbar, wurde dann immer blasser und war nach 5 Wochen nicht mehr zu erkennen.

HAMMEL (11)

eine Bande: 8 mm K/1 mm breit

sehr blaß, aber 4 Wochen nachweisbar. Nach 6 Wochen verblaßt. Eines der 11 untersuchten Tiere wies eine Zusatzbande auf: 1 mm K/1 mm breit, die bis zur 7. Woche nachweisbar blieb.

PFERD (6)

eine Bande: 2 mm K/1 mm breit

Diese Bande war 4 Wochen lang bei allen untersuchten Tierbluten nachweisbar. Nach 6 Wochen war sie verblaßt.

MAUS (6)

eine Bande: 19 mm K/3 mm breit

und RATTE (4)

eine Bande: 30 mm K/3 mm breit

Gut abgegrenzt ließen sich die LDH-Muster von Maus- und Rattenblut 6 Wochen lang nachweisen. Danach wurde die Bande breiter, verschwommener und war bei jeweils der Hälfte der Blutproben nach 11 Wochen verblaßt. Bei der anderen Hälfte ließ sich die Bande noch bis zur 20. Woche stark verbreitert darstellen, war dann allerdings von ebenfalls gealterten Blutproben anderer Tierarten nicht mehr, sondern nur noch von frischen sicher abgrenzbar.

ENTE (5)

eine Bande: 23 mm K/2 mm breit

Die Bande stellte sich 6 Wochen lang gut dar, wurde dann breiter und schwächer, und war nach 10 Wochen verblaßt.

HUHN (4)

eine Bande: 23 mm K/1 mm breit

In der Hälfte der Blutproben zeigte sich eine Zusatzbande: 19 mm K/1 mm breit, die allerdings auch bei diesen nicht konstant nachgewiesen werden konnte. Bei den Hühnerblutproben ergab sich ganz besonders die Schwierigkeit, daß sich die Banden nur sehr schwach darstellen ließen, und auch durch Konzentrierung der Extrakte nicht verstärkt werden konnten. Vielleicht konnte die 2. LDH-Bande aus diesem Grunde nicht bei allen Tieren, und auch nicht bei

einem Tier konstant, nachgewiesen werden. Die bei allen nachweisbare Einzelbande war 3 Wochen lang gut zu sehen, nach 10 Wochen war sie verblaßt.

GANS (7)

eine Bande: 22 mm K/1 mm breit

Sie konnte 6 Wochen lang bei allen Tieren gut nachgewiesen werden, wurde dann blasser und breiter, und war nach der 11. Woche nicht mehr sicher identifizierbar.

FASAN (4)

eine Bande: 21 mm K/2 mm breit

Die Bande war gut erkennbar über 6 Wochen, wurde dann breiter und verschmierter, und konnte nach 11 Wochen nicht mehr von benachbarten Banden unterschieden werden.

TAUBE (2)

eine Bande: 21 mm K/1 mm breit

Sie war bei beiden Blutproben 4 Wochen lang sicher nachweisbar, nach 9 Wochen bei einer verblaßt, bei der anderen stark verbreitert.

KRÄHE (1)

eine Bande: 24 mm K/3 mm breit

Hier konnte nur die Blutprobe eines Tieres dieser Spezies untersucht werden. Die Bande war 6 Wochen lang gut erkennbar, wurde dann immer schwächer und war nach 12 Wochen verblaßt.

HUND (13)

fünf Banden: 1. gleiche Stelle wie LDH-1 /1 mm breit
2. 8 mm K/1 mm breit
3. 17 mm K/1 mm breit
4. 26 mm K/1 mm breit
5. 34 mm K/1 mm breit

7 Hundeblutproben zeigten etwa eine Woche lang das 5-Banden-Muster. Bis zur 5. Woche waren dann nur noch die Banden 1 und 2 nachweisbar. Am längsten sah man die Bande 1, die erst nach 8 Wochen ganz verblaßte. Die anderen 6 Hundeblute zeigten von Anfang an nur die Banden 1 und 2, die Alterung verlief aber gleich.

KATZE (11)

fünf Banden: 1. 7 mm K/1 mm breit
2. 14 mm K/1 mm breit
3. 21 mm K/1 mm breit
4. 27 mm K/1 mm breit
5. 35 mm K/1 mm breit

Die Isoenzymbanden des Katzenblutes stellten sich insgesamt nur sehr schwach dar. 2 Proben zeigten eine Woche lang das 5-Banden-Muster, bis zur 3. Woche nur noch die Banden 1, 4 und 5. Danach war nur noch Bande 1 nachweisbar, die nach 5 Wochen verblaßte. Die Mehrzahl der Proben (9) zeigte von Anfang an nur Bande 1, die 5 Wochen lang nachweisbar war.

SCHWEIN (6) und WILDSCHWEIN (2)

fünf Banden: 1. 3 mm A/3 mm breit
2. 4 mm K/2 mm breit
3. 13 mm K/1 mm breit
4. 22 mm K/1 mm breit
5. 30 mm K/1 mm breit

Die Blutproben aller Tiere zeigten 3 Wochen lang alle 5 Banden, bis zu 5 Wochen waren die Banden 1, 4 und 5 stabil, die nach 8 (2 Tiere) oder 10 (4 Tiere) Wochen verblaßten.

Wildschweinblut unterschied sich weder im Bandenmuster noch im Alterungsverhalten von dem Blut der Hausschweine.

RIND (7)

fünf Banden: 1. 4 mm K/2 mm breit
2. 9 mm K/1.5 mm breit
3. 15 mm K/1 mm breit
4. 21 mm K/0,5 mm breit
5. 26 mm K/0,5 mm breit

5 der Blutproben zeigten 2 Wochen lang das 5-Banden-Muster, dann verschwanden zuerst die Banden 3-5, es folgte Bande 1, nach 7 Wochen war auch die stabilste Bande 2 nicht mehr nachweisbar. Bei 2 Tierblutproben stellten sich von Anfang an nur die Banden 1 und 2 dar, wobei auch hier Bande 2 die stabilere war.

REH (8)

Bei den Rehblutproben ebenso wie bei den folgenden 3 Tierspezies war das Finden der richtigen Verdünnung sehr schwierig.

vier Banden: 1. 4 mm K/0,5 mm breit
2. 9 mm K/2 mm breit
3. 17 mm K/0,5 mm breit
4. 29 mm K/3 mm breit
diese Bande schmierte bei einer mittleren Verdünnung, bei der auch die Banden 1 und 3 sichtbar waren, regelmäßig von 23 mm K bis 29 mm K, dabei in der Höhe zunehmend.

Bei 7 Proben waren alle 4 Banden 3 Wochen lang gut nachweisbar, wurden dann breiter und blasser, nur Bande 1 war 6 Wochen lang unverändert zu sehen und verschwand nach 8 Wochen.

Eine Probe zeigte von Beginn an nur Bande 1, die 8 Wochen lang erhalten blieb.

HIRSCH (5)

fünf Banden: 1. 4 mm K/0,5 mm breit
2. 10 mm K/0,5 mm breit
3. 12 mm K/0,5 mm breit
4. 17 mm K/0,5 mm breit
5. 29 mm K/4 mm breit
diese Bande schmierte bei entsprechender Verdünnung von 22 m K bis 29 mm K, an Intensität zunehmend.

Auch bei den Hirschbluten mußte man wie bei den Rehbluten ein breites Schmieren der langsam wandernden Bande in Kauf nehmen, wenn man die schwachen Banden 1-4 darstellen wollte. Bei allen Proben war das 5-Banden-Muster 5 Wochen lang gut erkennbar. Dann waren die Banden 2 und 3 einerseits, Banden 4 und 5 andererseits nicht mehr voneinander zu trennen. Nach 12 Wochen war das Muster bei 2 Proben verblaßt, bei den übrigen 3 Proben stark verschmiert und nicht mehr in einzelne Banden aufzugliedern.

HASE (9)

fünf Banden: 1. 2 mm K/2,5 mm breit
2. 9 mm K/1 mm breit
3. 16 mm K/2 mm breit
4. 22 mm K/3 mm breit
5. 29 mm K/4 mm breit

8 der 9 Proben wiesen die 5 Banden auf. Eine Probe zeigte nur die Banden 1, 4 und 5. Nach 4 Wochen verschwanden bei 6 Tierbluten die Banden 2-5 in unterschiedlicher Reihenfolge. Die stabilste Bande 1 verblaßte nach 20 Wochen. Bei 3 Proben konnte noch nach 20 Wochen eindeutig das 5-Banden-Muster erkannt werden.

WILDKANINCHEN (5)

fünf Banden: 1. 5 mm K/3 mm breit
2. 10 mm K/1 mm breit
3. 17 mm K/2 mm breit
4. 23 mm K/3 mm breit
5. 29 mm K/4 mm breit

Alle 5 Banden stellten sich 4 Wochen lang gut dar. Dann verschwand bei 2 Proben die Bande 4 vor Bande 3. Bande 1, 2 und 5 waren nach 10 Wochen stark verschmiert und verbreitert. Eine Blutprobe zeigte bis zur 12. Woche einen alle Banden überdeckenden breiten Schmierstreifen. Bei 2 Proben ließen sich noch nach 20 Wochen eindeutig alle 5 Banden darstellen.

HAUSKANINCHEN (5)

zwei Banden: 1. 5 mm K/3 mm breit
2. 12 mm K/2 mm breit

Diese 2 Banden wiesen 3 der 5 Blutproben auf. Sie waren 5 Wochen lang gut erkennbar. Dann stellte sich nur noch Bande 1 dar, die bei den anderen Proben von Beginn an nur allein vorhanden war. Nach 6 Wochen wurde die Spur blasser und war nach 8 Wochen nicht mehr zu sehen (3 Tiere), oder unkenntlich verbreitert zu erkennen bis zur 12. Woche (2 Tiere).

INSEKTEN (-BLUT)

Es wurden je 3 Eluate aus 3 verschiedenen Windschutzscheiben-Spuren untersucht. Eine Enzymaktivität konnte jedoch nie nachgewiesen werden.

FUCHS (1)

fünf Banden: 1. gleiche Stelle wie LDH-1/ 4 mm breit
2. 7 mm K/2 mm breit
3. 15 mm K/1 mm breit
4. 23 mm K/1 mm breit
5. 31 mm K/1 mm breit

Die Banden stellten sich in ihrer Intensität dem Menschenblut vergleichbar dar. Die Menge der Fuchsblutspur war so gering, daß keine Alterungsversuche mehr gemacht werden konnten (Abb.4).

MENSCH (15)

drei Banden: 1. LDH-1
2. 8 mm K/1 mm breit
3. 18 mm K/1 mm breit

In 4 Fällen stellte sich die LDH-2 bei ganz frischen Spuren als Doppelbande dar. Bei unseren Untersuchungen kam es darauf an, frische Menschenblutproben als Bezugspunkt zu haben. Es war nicht das Ziel dieser Arbeit, hier Alterungsverhalten zu untersuchen. Aus diesem Grunde werden die Ergebnisse von SCHMITT übernommen, die etwa zur gleichen Zeit gewonnen wurden.

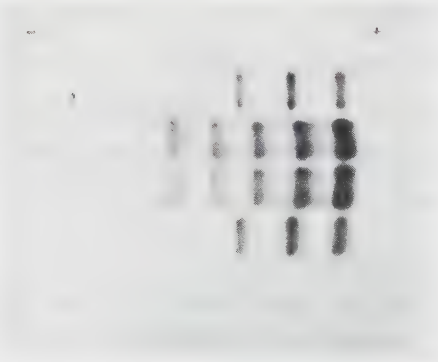


Abb.4 Pherogramm von der Blutspur eines Fuchses (2 und 3), menschliches Pherogramm zum Vergleich (1 und 4)

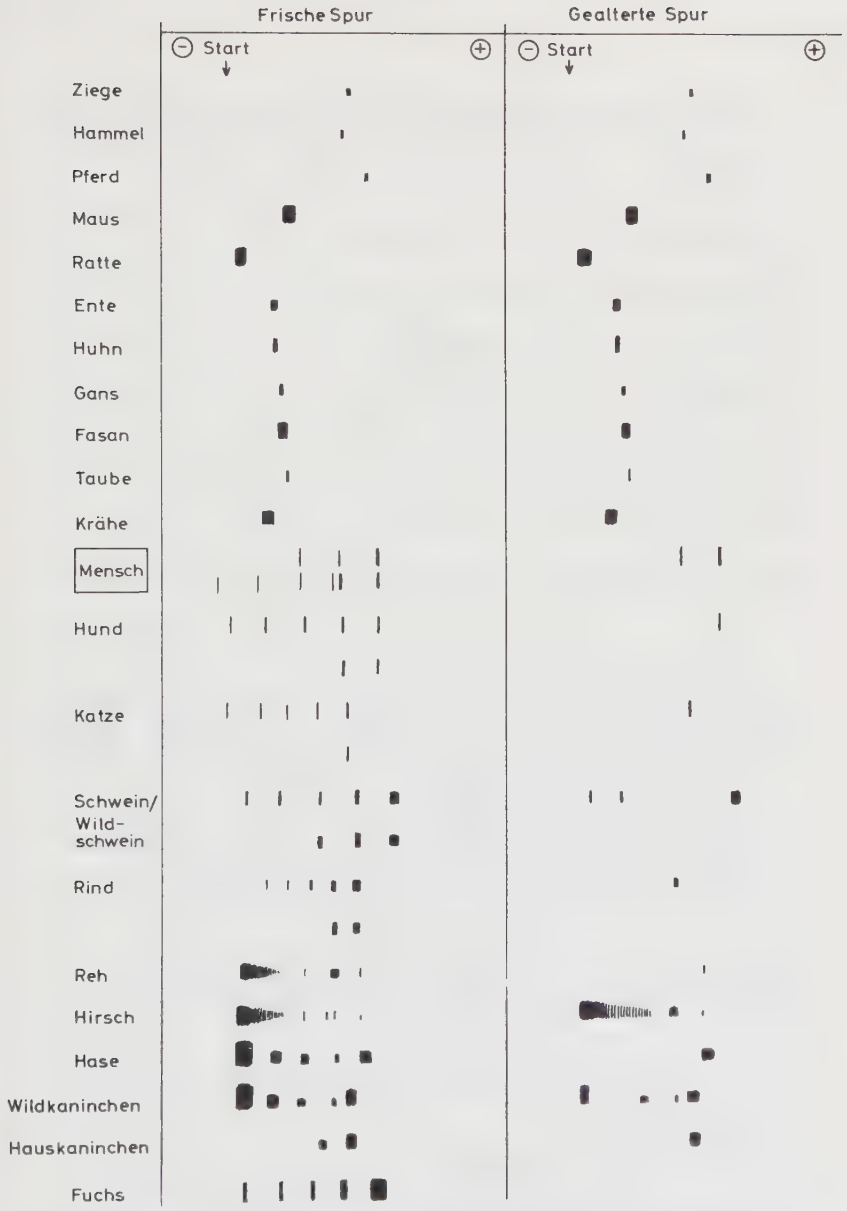


Abb.5 Schematische Darstellung der LDH-Muster aus Blutspuren verschiedener Spezies. Lagerung der frischen Spuren 1 Woche, der gealterten etwa 6 Wochen, jeweils bei Zimmertemperatur

2.3. Besprechung der Befunde und Vergleich mit Literaturdaten

In den schon oben (2.1.4.) erwähnten Untersuchungen von WIELAND und PFLEIDERER berichteten die Autoren über die Heterogenität der LDH und über den sich über alle Säugetiergattungen erstreckenden Unterschied zwischen Skelett- und Herzmuskelenzymen. Kurze Zeit später erschien eine Reihe von Veröffentlichungen, die darauf hinwiesen, daß nahezu alle Gewebe und Organe der Säugetiere und des Menschen sicher 5 elektrophoretisch deutlich unterscheidbare Isoenzyme aufweisen können (WIELAND u. Mitarb. 1963). In den Zellen der übrigen Wirbeltiere und einiger Wirbelloser ist die LDH auch nachweisbar (MARKERT und URSPRUNG). Diese niederen Tierarten scheinen sich durch eine geringere Bandenzahl auszuzeichnen. So fanden WIELAND u. Mitarb. (1959) in allen Organextrakten von Huhn und Taube nur eine nachweisbare Bande.

Es kann heute als gesichert gelten,

-daß Organe charakteristische LDH-Isoenzym-Muster aufweisen,

-daß die Organmuster innerhalb einer Spezies große Ähnlichkeit aufweisen,

-daß zwischen den Organmustern identischer Organe von Spezies zu Spezies charakteristische Unterschiede gefunden werden,

-daß sich die Organmuster homologer Organe bei höheren Tieren innerhalb einer Tierklasse (z.B. der Säuger) ähnlich sind, während sich bei niederen Tieren (z.B. bei Fischen) starke Abweichungen finden (KCWALEWSKI, 1975).

Diese Vielfalt der LDH-Isoenzym-Muster weist den Weg zur spezifischen Artunterscheidung. Da in den Erythrozyten etwa 150mal mehr LDH enthalten ist als im Serum, wird man an Blutspuren vorwiegend das Enzym-Muster der roten Blutkörperchen bestimmen. Die Erythrozyten gehören hinsichtlich ihres LDH-Musters in die Gewebe-Gruppe vom Herzmuskeltyp mit einem Aktivitätsmaximum der anodischen Banden.

Es gibt zahlreiche Untersuchungen über LDH-Isoenzym-Muster bei Tieren. Hierbei war das Untersuchungs-Material jedoch selten Serum oder Erythrozytensediment. In den oben (1.1.,1.2.) genannten Untersuchungen von MADIWALE u. Mitarb. wurden Blutspuren von je 5 Tieren der Spezies Kaninchen, Ochse, Büffel, Ziege und Schaf mit der Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gel untersucht. Dabei wurden die Isoenzyme der LDH, MDH und Peroxydase aufgetrennt (Tabelle 3).

Spezies	Zahl der Banden: Peroxydase	LDH
Mensch	3	5
Kaninchen	1	4
Schaf	1	3
Ziege	1	3
Ochse	1	5
Büffel	2	5

Tab.3 Isoenzym-Eigenschaften von Säugetierarten, untersucht an Blutspuren (MADIWALE u. Mitarb., 1972,2)

MADIWALE u. Mitarb. (1972,2) erhielten reproduzierbare Ergebnisse bei der Untersuchung trockener Blutspuren, sowohl wenn die Spuren frisch hergestellt wurden, als auch nach 4-wöchiger Lagerung bei Zimmertemperatur, bei geringer und hoher Luftfeuchtigkeit. Sie berichten sogar über die Unterscheidungsmöglichkeit nahe verwandter Arten wie Ziege und Schaf.

WIELAND u. Mitarb. veröffentlichten 1959 LDH-Befunde bei uns heimischer Tiere (Tab.4). Mit Hilfe der Hochspannungs-Elektrophorese auf CA-Folien fanden sie bei allen Untersuchungen bestätigt, daß es auch im Tierreich einen Herztyp mit Hauptgehalt der Aktivität in rasch wandernden Komponenten und einen Skelettmuskeltyp mit Hauptaktivität in der am wenigsten beweglichen Bande gibt.

Spezies	Zahl der Banden in			
	Herz	Skelett-muskel	Leber	Niere
Hund	5	5	5	5
Katze	4	4	2	5
Schwein	4	/	5	4
Hammel	3	4	4	3
Maus	3	2	2	5
Ratte	5	5	1	5
Kaninchen	5	5	5	5
Huhn	1	1	1	1
Haustaube	1	1	1	1

Tab.4 Anzahl der elektrophoretisch trennbaren LDH-Banden in verschiedenen Organen von Wirbeltieren (WIELAND u. Mitarb., 1959)

Bei allen höher entwickelten Tieren und beim Menschen scheint in fast allen Organen ein 5-Banden-Muster nachweisbar zu sein. Es kann als gesichert gelten, daß auch im Tierreich das LDH-Molekül als Tetramer vorliegt, wobei verwandte Spezies eine ähnliche Aminosäuren-Komposition ihrer H- und M-Untereinheiten aufweisen, zwischen entfernten Tierklassen aber größere Unterschiede bestehen (KOWALEWSKI, 1972 u.1975).

Wir fanden bei folgenden Tieren ein 5-Banden-Muster: Hund, Katze, (Wild-)Schwein, Rind, Reh, Hirsch, Hase, Wildkaninchen und Fuchs. MADIWALE u. Mitarb. (1972,2) beschreiben innerhalb einer Art keine Abweichungen vom Enzym-Muster. Lediglich die Intensität der Banden schwankt. Bei unseren Untersuchungen ließen sich nicht bei allen Tieren derselben Spezies immer alle 5 Banden

darstellen. Unter Umständen reichte dort die Aktivität des Isoenzyms nicht aus, um mit unserer Methode sichtbar gemacht werden zu können. WIELAND u. Mitarb. (1959) wiesen darauf hin, daß nur diejenigen Komponenten, deren Anteil an der Gesamtaktivität 5 % übersteigt, erfaßbar sind. Bei der Spezies Rind stimmen unsere Ergebnisse hinsichtlich der Bandenzahl mit den Angaben von MADIWALE u. Mitarb. (1972,2) überein. Die Untersuchung von Kaninchenblut ergab dort aber nur 4 Banden. WIELAND u. Mitarb. (1959) beschrieben für viele Organe von Hund, Katze, Hausschwein und Kaninchen ein 5-Banden-Muster. Für die übrigen Tiere dieser Gruppe existieren keine Vergleichswerte.

Bei den übrigen von uns untersuchten Tierarten stellte sich immer nur eine einzige Isoenzym-Bande dar. Lediglich 3 von 5 Hauskaninchen zeigten 5 Wochen lang ein 2-Banden-Muster, und bei 2 von 4 Hühnern stellte sich bei der Erstuntersuchung eine instabile Zusatzbande dar. Diese Befunde stehen einerseits im Gegensatz zu Ergebnissen von MADIWALE u. Mitarb. (1972,2) bezüglich Ziege und Schaf, und von WIELAND u. Mitarb. (1959) bezüglich Maus, Ratte und Hammel. Andererseits stimmen sie überein mit der Tatsache, daß niedere Tierarten wenige LDH-Banden aufweisen, die näher kathodenwärts liegen. WIELAND u. Mitarb. (1959) fanden in allen von ihnen untersuchten Organen von Huhn und Haustaube ebenfalls nur eine Isoenzymbande.

Die von uns untersuchten Tierarten lassen sich anhand folgender Kriterien in Gruppen unterteilen:

-Zahl der Banden
-Färbeverhalten = Isoenzymaktivität
-Alterungsverhalten

Läßt man die Zahl der Banden, die bereits erörtert wurde, außer acht, so lassen sich die Tierspezies in drei Gruppen mit größerer Übereinstimmung unterteilen:

a) Ziege, Hammel, Pferd, Huhn, Katze, Hund

b) Ente, Gans, (Wild-)Schwein, Rind, Hauskaninchen, Fuchs

c) Maus, Ratte, Fasan, Taube, Krähe, Reh, Hirsch, Hase, Wildkaninchen

Gruppe a zeichnet sich durch geringe Enzymaktivität aus, Gruppe b ist diesbezüglich dem Menschenblut vergleichbar, während Gruppe c sehr hohe Aktivitäten aufweist, immer bei vergleichbarer Verdünnung der Blutspuren-Extrakte. Durch verschiedene Erkrankungen, biologische Alterung und Traumen ändert sich beim Menschen das im Serum nachweisbare Isoenzym-Muster hinsichtlich der Aktivität der einzelnen Banden sowie der Serum-Gehalt an Gesamt-LDH. Diese Möglichkeiten muß man auch für Tiere annehmen. Die Blute der Gruppe a wurden alle durch Blutentnahme bei lebenden Tieren gewonnen. Lediglich Hühnerblut erhielten wir durch Schlachtung der Tiere. Die meisten Tiere der Gruppe c sind wildlebende Tiere, die geschossen wurden, was einem erheblichen Trauma gleichkommt.

Vielleicht ist so die Tatsache zu deuten, daß das Blut dieser Tiere sehr viel mehr verdünnt werden mußte, um verwertbare Ergebnisse zu bekommen.

Alterung

Unsere Blutproben wurden trocken bei Zimmertemperatur gelagert und über 20 Wochen beobachtet. Die Alterung machte sich bei der Elektrophorese folgendermaßen bemerkbar (Abb.5 und Tab.5):

- -durch Bandenverlust bei Mehrbanden-Mustern
- -durch Breiter- und Verschwommenerwerden der Banden
- -oder durch eine alle Isoenzymbanden einschließende breite Anfärbung

Auch hier konnte man ein ähnliches Verhalten innerhalb der Gruppen beobachten. Die in Gruppe a von Anfang an nur schwachen Banden wurden schnell sehr blaß und waren nie länger als 4-6 Wochen nachweisbar. Bei Katzen- und Hundeblut war das vollständige Muster nur eine Woche lang zu sehen. Das andere Extrem bildeten Hasen- und Kaninchenblut. Hier konnte in einigen Fällen (3 von 9 Hasen- und 2 von 5 Wildkaninchenbluten) noch nach 20 Wochen ein klares eindeutiges 5-Banden-Muster dargestellt werden, das im Vergleich zur frischen Spur sichtbar nichts an Aktivität verloren hatte. MADIWALE u. Mitarb. (1972,2) hatten ihre Spuren über einen Zeitraum von 4 Wochen beobachtet und dabei keine alterungsbedingten Veränderungen festgestellt.

Tab. 5 Nachweisdauer der LDH-Muster in Wochen mit Hilfe der CAF - Elektrophorese

Spezies	n	eindeutig	verändert	verblasst
Ziege	5	1		5
Hammel	11	4		6
Pferd	6	4		6
Maus	6	6		11 (-20)
Ratte	4	6		11 (-20)
Ente	5	6		10
Huhn	4	3		10
Gans	7	6		11 (-15)
Fasan	4	6		11
Taube	2	4		9
Krähe	1	6		12
Hund	13	1	5	8
Katze	11	1	3	5
Schwein	6	3	6	8 (-10)
Wildschwein	2	3	6	8 (-10)
Rind	7	2	7	7
Reh	8	3	6	8
Hirsch	5	5	6	12
Hase	9	4 (-20)		
Wildkaninchen	5	4 (-20)		
Hauskaninchen	5	5	6	8

Bei den Mehrbanden-Mustern wurde beobachtet, daß die schneller anodenwärts wandernden Fraktionen die stabileren waren. So stellte sich bei Hund, Katze, Reh, Hase und Hauskaninchen das LDH-1-Isoenzym am längsten dar. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen an Menschenblut (SCHMITT).

Unterscheidung der Tierblute untereinander und ihre Abgrenzung von Menschenblut

Besonders innerhalb der Säugetier-Gruppe fand sich eine ausgeprägte Variationsbreite. Vom menschlichen Enzym-Muster waren alle Tierblute gut abgrenzbar bis auf Hundeblut. Die Isoenzyme 1 und 2 verhielten sich bei Mensch und Hund identisch, das Isoenzym 3 nur unwesentlich anders. Im frischen und gealterten Zustand ist somit Hundeblut mit dieser Technik nicht sicher von Menschenblut abgrenzbar. Bei den übrigen Tierbluten ist eine Verwechslung mit Menschenblut sowohl an frischen wie an gealterten Spuren unwahrscheinlich.

Die Artunterscheidung mit immunologischen Methoden läßt immer noch im Stich bei Kreuzreaktionen infolge von Antigen-Verwandtschaft. So ist es nicht möglich, Hammel und Ziege, Reh und Hirsch, Schwein und Wildschwein sowie Mensch und Schimpanse zu differenzieren. Wir hatten gehofft, mit den LDH-Isoenzymen eine Möglichkeit zur Unterscheidung zu finden. Die Artverwandtschaft macht sich

jedoch auch hier bemerkbar. Schwein und Wildschwein zeigen ein völlig identisches Isoenzym-Verhalten, Hammel und Ziege einerseits, Reh und Hirsch andererseits unterscheiden sich in ihrem Isoenzym-Muster jeweils nur so geringfügig, daß eine Identifizierung, wenn überhaupt, dann nur möglich ist, wenn die beiden entsprechenden Partner gleichzeitig in einer Elektrophorese möglichst an benachbarten Positionen aufgetrennt werden (2.2.2.4.). Nur so ist es möglich, die geringen Wanderungs-Unterschiede zu erkennen. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen fanden MADIWALE u. Mitarb. (1972,2) bei Ziegen- und Schafsblut jeweils 3 Isoenzymbanden, die gut voneinander abgrenzbar waren.

Schimpansenblut konnte von uns leider nicht untersucht werden. Es spielt in unseren Breiten - im Gegensatz zu Indien - in der Praxis auch keine Rolle. MOKASHI und MADIWALE (1974) weisen darauf hin, daß die gleichzeitige Betrachtung der Isoenzym-Muster von Peroxydase, LDH und MDH die Unterscheidung Mensch-Schimpanse erlaubt. GROBBELAAR u. Mitarb.(2)fanden ein Antihumanglobulin-Reagens, das durch menschliches Serum vollständig inhibiert wird, von Affenblut jedoch nur unvollständig, und das so die Differenzierung erlaubt. SIVARAM u. Mitarb. konnten in einem Fall die Blutspur eines Rhesusaffen im Ouchterlony-Test (Spornbildung) und immunelektrophoretisch (Positionsdifferenz) von Menschenblut unterscheiden.

Insekten(-blut)

Es kommt vor, daß zum Beispiel nach Autounfällen Blutspuren an einer Windschutzscheibe zu untersuchen sind. In diesem Zusammenhang stellte sich uns die Frage, ob überhaupt und in welchem Ausmaß Insekten(-blut) die Isoenzym-Bestimmung an menschlichen oder tierischen Blutspuren stören kann. Es wurden Insekten untersucht, die von den Windschutzscheiben einiger Fahrzeuge abgewischt und abgekratzt worden waren, um möglichst praxisnahe Bedingungen zu schaffen. Eine Enzym-Aktivität wurde in keiner Untersuchung nachgewiesen. Unter Umständen lag das negative Ergebnis aber daran, daß die Eluate nicht genügend angereichert werden konnten.

Eine Störung des LDH-Musters durch Insekten(-blut) oder -überreste ist bei Anwendung der beschriebenen Technik jedenfalls nicht anzunehmen.

Menschenblut

Menschenblut diente bei dieser Arbeit nur als Vergleichsgröße. Es wurden daher von uns auch keine Alterungsversuche gemacht. Von SCHMITT wurde ermittelt, daß auch beim menschlichen Isoenzym-Muster die schnellste Fraktion am längsten erhalten bleibt. Ab einem Spurenalter von 14 Tagen blaßt zunächst die LDH-3 vor der LDH-2 und der LDH-1 ab. Damit korreliert die Haltbarkeit der Isoenzyme in Blutspuren mit ihrer jeweiligen Halbwertszeit.

Es wurden erwartungsgemäß keine Varianten gefunden. In 4 von 15 Fällen stellte sich bei ganz frischen Spuren die LDH-2 zunächst als Doppelbande dar. BLANCO und ZINKHAM beobachteten diese Doppelbande bei vertikaler Elektrophorese und nahmen physikochemische Wechselwirkungen als Ursache an.

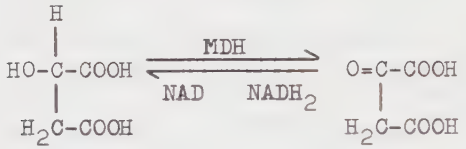
Menschliche Blutspuren können auch einmal durch Menstruations-, Geburts- oder Leichenblut verursacht sein. Hierbei findet man stärker ausgeprägte Fraktionen LDH-4 und LDH-5, die im (normalen) Venenblut kaum nachweisbar sind (ASANO u. Mitarb., SCHMITT, OEPEN u. Mitarb.).

Auch wenn es also mit dieser Methode der Isoenzym-Bestimmung nicht möglich ist, einige artverwandte Tierarten voneinander zu unterscheiden, ist sie doch eine Bereicherung für die rechtsmedizinische Blutart-Unterscheidung. Sie ist eine wirtschaftliche und wenig schwierige Methode, die nicht nur die Alternativaussage - Menschenblut vorhanden oder nicht - gestattet, sondern konkrete Hinweise auf die spezies-spezifische Herkunft einer Blutspur gibt.

3. MALATDEHYDROGENASE (EC 1.1.1.37)

3.1. Biochemie und Polymorphismus

Die MDH, ein Enzym des Zitratzyklus, katalysiert reversibel die Umwandlung von L-Malat zu Oxalacetat mit NAD als Coenzym.



L-Malat Oxalacetat

Auch die MDH ist hinsichtlich ihrer Struktur und ihres biochemischen Verhaltens kein einheitliches Enzym. Die eine, lösliche Form findet sich wie die LDH im Zytoplasma von Erythrozyten und Leukozyten. Sie wird als s-Form bezeichnet und wandert bei der elektrophoretischen Auftrennung bei pH 8,6 anodenwärts. Sie ist Gegenstand der meisten bisher vorliegenden Untersuchungen. Die kathodisch wandernde, mitochondriale Form der MDH, die m-MDH, findet sich in Leukozyten und Plazentazellen. Definitionsgemäß gehören die beiden Formen wegen ihres gemeinsamen Vorkommens in einer Zellart zu den Isoenzymen.

s-MDH

Normalerweise findet man in unseren Breiten bei der Untersuchung von Hämolysaten ein Ein-Banden-Muster anodenwärts der Auftragstelle. LEAKEY faßte 1972 die bisher bekannten Varianten zusammen (Abb.6):

Die erste wurde von DAVIDSON u. Mitarb. beschrieben. Sie besteht aus 3 Banden, von denen die schnellste der sonst vorhandenen Einzelbande entspricht. Nach Dissoziation der Enzyme in inaktive Untereinheiten und anschließender Rekombination stellten sie folgende Hypothese auf: die MDH ist ein Dimer, im Normalfall homozygot. Die gefundene Variante sei das Resultat der freien Kombination einer normalen Untereinheit mit einer langsamer wandernden. Es müssen demnach 3 Banden entstehen mit der Zusammensetzung:

schnellste Bande: 2 normale Untereinheiten

mittlere Bande: 1 normale + 1 langsame Untereinheit

langsame Bande: 2 langsame Untereinheiten

Familiendaten ergaben, daß Varianten und normale Untereinheiten kodominant vererbt werden.

BLAKE u. Mitarb. bestätigten diese Befunde und erhärteten die Hypothesen. Sie fanden eine Variante, die ebenfalls aus 3 Banden besteht, deren langsamste aber der Normal-Bande entspricht.

LEAKEY u. Mitarb. benannten die von DAVIDSON u. Mitarb. gefundene Variante s-MDH 2-1, die von BLAKE u. Mitarb. beschriebene s-MDH 3-1. Sie selbst beschrieben die dritte Variante, die nur aus einer Bande besteht, der schnellsten BLAKE-Variante entspricht und für diese Variante homozygot ist. Sie nannten sie s-MDH 3-3. Es ist noch nicht geklärt, ob die schnelle und die langsame Variante Produkte von Allelen auf einem einzigen Genlocus sind.

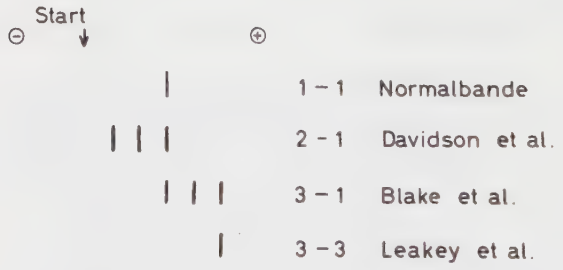


Abb.6 s-MDH-Phänotypen aus menschlichen Erythrozyten, schematisch nach LEAKEY u. Mitarb.

TARIVERDIAN u. Mitarb. wiesen 1971 vier Varianten bei nicht-humanen Primaten nach, wobei der s-MDH-1-Phänotyp am häufigsten vorkam, die Frequenz schnell wandernder Varianten geringer war, und sich offenbar auf bestimmte Spezies beschränkt (ANANTHAKRISHNAN u. Mitarb.).

m-MDH

Auch bei der m-MDH wurden elektrophoretisch auftrennbare Varianten von DAVIDSON u. Mitarb. beschrieben. Populationsuntersuchungen liegen jedoch noch nicht vor.

3.2. Material und Methode

3.2.1. Material

Es wurde dasselbe Material verwendet wie bei der LDH-Untersuchung. Auch der Ansatz der Spuren-Extrakte unterschied sich nicht von dem unter 2.2.1.1. und 2.2.2.2. beschriebenen Verfahren.

3.2.2. Methode

Die Isoenzyme der MDH wurden auf CA-Folien aufgetrennt. Als Brückenpuffer wurde dabei 0,05 N Na-Veronalpuffer (pH 8,6) verwendet (Rezept 2.2.1.2.1., ASANO u. Mitarb.) Die Elektrophoresedauer betrug 60 und 90 min. Im übrigen entsprachen die Versuchsbedingungen denen der LDH-Isoenzym-Auftrennung.

a) Färbung der MDH-Isoenzyme (nach LEAKEY u. Mitarb.)
Die Darstellung der elektrophoretisch getrennten Isoenzym-Muster beruht auch hier auf der Koppelung der enzymspezifischen Reaktion mit einer Farbreaktion mit Hilfe von Phenazinmethosulfat. Als Substrat wird L-Malat umgesetzt.

Reagenzien: TRIS
HCl
L-Malat (Äpfelsäure)
PMS (Phenazin-Methosulfat)
NAD (Nicotinamid-adenin-dinucleotid)
MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazolyl-2)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid)

b) Herstellung des Färbepuffers/ 0,1 M TRIS-HCl-Puffer (pH 8,0):

6,1 g TRIS
in etwa 300 ml Aqua dest. lösen
16 ml 1 N HCl zur Einstellung auf pH 8,0
Aqua dest. ad 500 ml

c) Herstellung der Färbelösung:

50 mg L-Malat
5 mg NAD
5 mg PMS
5 mg MTT
in 50 ml Färbepuffer lösen.

Die Folien werden in dieser Lösung für 45 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Herausnahme werden sie kurz mit Aqua dest. überspült und die Befunde sofort abgelesen, wie auch für die LDH beschrieben (2.2.1.2.3. und 2.2.1.2.4.).

3.3. Versuche

Die MDH-Isoenzymbanden stellten sich von Anfang an nur sehr schwach und unscharf dar. Es wurde versucht, durch Änderung sowohl der Elektrophorese- als auch der Färbedauer eine Besserung zu erzielen, was aber nicht gelang. Außerdem wechselte die Darstellung der Bandenzahl innerhalb einer Tierspezies, oder sogar bei demselben Tier, so daß es unmöglich war, sicher reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Ergebnisse im Einzelnen: Als Bezugsgröße wurde die MDH-Isoenzym-Bande des Menschen gewählt. Die Symbole sind wie unter 2.2.3. angegeben (A = anodenwärts, K = kathodenwärts des Bezugspunktes).

FASAN (1)

zwei Banden: 1. 15 mm K/0,5 mm breit
2. gleiche Stelle wie menschliche MDH/1 mm breit

TAUBE (2)

zwei Banden: 1. 15 mm K/0,5 mm breit
2. gleiche Stelle wie menschliche MDH/1 mm breit

KRÄHE (1)

eine Bande: 4 mm K/1 mm breit

ENTE (5)

zwei Banden: 1. 10 mm K/0,5 mm breit
2. gleiche Stelle wie menschliche MDH/1 mm breit

Die 2. Bande war bei allen Untersuchungen und jedem einzelnen Tier nachweisbar. Zwei Tiere zeigten ein 2-Banden-Muster.

HUHN (4)

eine Bande: gleiche Stelle wie menschliche MDH/1 mm breit

3 der 4 Tiere zeigten nur eine Bande. Bei einem Tier stellte sich bei der Erstuntersuchung eine Doppelbande dar, die aber nicht reproduzierbar war.

GANS (4)

eine Bande: gleiche Stelle wie menschliche MDH/1 mm breit

Bei 3 der Tiere ließ sich diese Bande darstellen. Das 4. Tierblut blieb stumm.

HASE (9)

(5 Hasen, 3 Hauskaninchen, 2 Wildkaninchen)

eine Bande: 1 (bis 3) mm A/3 mm breit

Diese eine Bande stellte sich in zwar gering unterschiedlicher Breite, aber bei allen Tieren dar. Es gab viele Zusatzbanden, die jedoch alle nicht reproduzierbar waren. Lediglich in einem Fall stellte sich bei 3 Kontroll-Untersuchungen immer eine Bande am Startpunkt mit dar.

MAUS (6)

eine Bande: 2 mm A/1 mm breit

Eine bei allen Tieren nachweisbare Bande. Es traten nie Zusatzbanden auf.

RATTE (4)

eine Bande: 2 mm A/1 mm breit

Bei allen Tieren ohne Zusatzbanden darstellbar.

HUND (13)

eine Bande: 4 mm A/1 mm breit

Diese Bande trat bei 9 Tieren zuverlässig auf. Ein Tierblut zeigte eine Zusatzbande, die bei Kontroll-Untersuchungen nicht mehr zu sehen war. 3 Tierblute waren stumm.

KATZE (10)

eine Bande: 4 mm A/1 mm breit

4 Tiere zeigten diese Bande immer, ein Tier nur unzuverlässig, 5 Tierblute stellten sich nicht dar.

SCHWEIN (6), WILDSCHWEIN (2)

eine Bande: 6 mm A/1 mm breit

Diese Bande stellte sich immer dar. Bei 2 Tierbluten fanden sich nur bei der Erstuntersuchung Zusatzbanden.

RIND (7)

eine Bande: 6 mm A/1 mm breit

Bei allen Tieren nachweisbare Bande ohne Zusatzbande.

PFERD (5)

eine Bande: 6 mm A/1 mm breit

Bei allen Untersuchungen fand sich diese Bande ohne Zusatzbande.

REH (6)

eine Bande: 6 mm A/1 mm breit

Diese Bande ließ sich bei 5 Tieren immer darstellen, 2 Tierblute zeigten flüchtige Zusatzbanden. Ein Tierblut blieb stumm.

HIRSCH (2)

eine Bande: 6 mm A/1 mm breit

Immer sich darstellende Bande mit wechselnder Zusatzbande bei einem Tier.

HAMMEL (10)

zwei Banden: 1. 2 mm A/0,5 mm breit

2. 6 mm A/1 mm breit

5 Tierblute zeigten zuverlässig das 2-Banden-Muster. Bei 3 Tieren konnte nur die schnellere anodenwärts wandernde Bande dargestellt werden. 2 Blute blieben stumm.

ZIEGE (4)

Bei den 4 untersuchten Ziegenbluten stellte sich nie eine Bande dar.

MENSCH (15)

eine Bande: etwa 15 mm vom Startpunkt entfernt /1 mm breit

Alle Menschenblutproben zeigten diese Bande ohne Zusatzbanden.

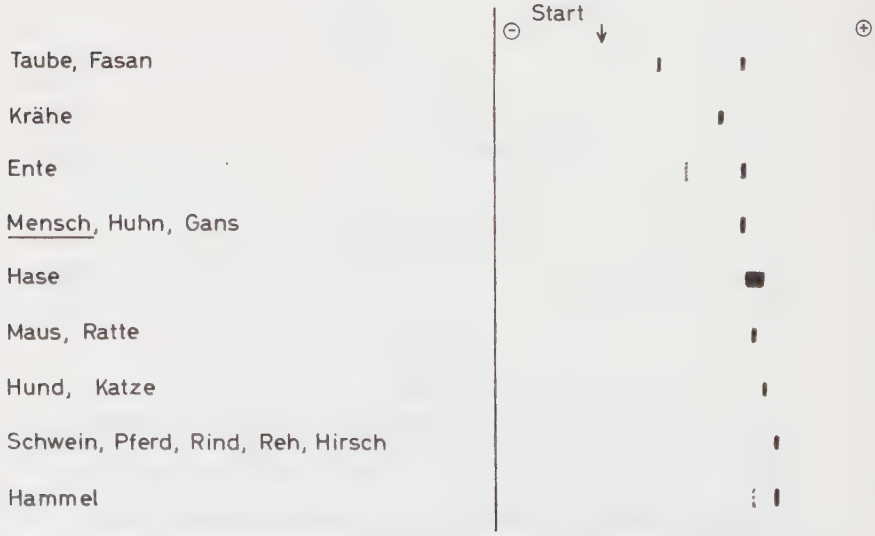


Abb.7 MDH-Isoenzym-Muster aus Blutspuren verschiedener Spezies

3.4. Besprechung der Befunde

Das Ergebnis der Untersuchungen nach der Methode von ASANO u. Mitarb. und der Anfärbung nach LEAKEY u. Mitarb. war nicht befriedigend. Trotz Änderung der Elektrophoresedauer und der Färbedauer konnte keine bessere Darstellung der Bandenmuster erreicht werden. Eine Verdoppelung der Färbesubstanzen ergab keine stärkere Anfärbung. Eine Verdünnung der Tierblute von nur 1+4 statt 1+8 änderte nichts an dem Ergebnis, weder bezüglich der Intensität noch der Konstanz der Banden. Wie aus Abb.7 ersichtlich, unterscheiden sich die Banden verschiedener Tierarten kaum oder gar nicht voneinander. Folgende Befunde wurden erhoben:

a) Ein sicher vom Menschen abweichendes Muster zeigten nur: Taube, Fasan und Krähe, wobei Taube und Fasan nicht voneinander unterschieden werden konnten.

b) Gleichartiges Muster wie Menschenblut zeigten: Huhn, Gans und Ente (in 3 von 5 Fällen). Diese Spezies waren somit nicht vom Menschen oder untereinander abgrenzbar.

c) Die übrigen Tierblute wanderten schneller als die Menschenblutbande. Hase, Maus und Ratte unterschieden sich weniger durch die Position der Bande, als durch die Breite und Intensität der Anfärbung. Hasenblut zeigte keinen Unterschied zu Wild- oder Hauskaninchen-

blut, alle stellten sich in einer etwa 3 mm breiten, gut anfärbbaren Bande dar. Die vielen Zusatzbanden sind nicht aufgeführt, da sie lediglich in einem Fall konstant nachgewiesen werden konnten. Maus- und Rattenblut, das an gleicher Stelle eine lediglich schmalere Bande zeigte, konnte jedoch allein durch die Breite der angefärbten Zone nicht genügend sicher von Hasenblut unterschieden werden.

Die MDH-Isoenzymbande von Hund und Katze waren nicht so zuverlässig darstellbar.

Die Bande der größten Gruppe wanderte schneller als die bisher beschriebenen: Schwein, Wildschwein, Pferd, Rind, Hammel, Reh und Hirsch. 5 Hammelblute konnten von dieser Gruppe abgegrenzt werden durch eine bei diesen Tieren in allen Fällen beobachtete Zusatzbande. Die Zusatzbanden aller Tier-Muster wurden in Abb.7 in den meisten Fällen nicht beachtet, weil sie nicht konstant auftraten.

Die Auftrennung der Tierblute ergab in den meisten Fällen ein Ein-Banden-Muster. Lediglich Taube, Fasan, Hammel (5 von 10) und Ente (2 von 5) zeigten 2 Isoenzymmuster.

LEAKEY u. Mitarb. trennten MDH- und LDH-Isoenzyme aus Hämolysaten mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese in einem Arbeitsgang auf und färbten sie auf einem Block an, indem sie gleichzeitig beide enzymspezifischen Substrate

zugaben. Sie beschrieben, daß dabei das normale, bei Europiden zu erwartende, Ein-Banden-Muster der MDH kathodenwärts der LDH-3-Isoenzymbande zu liegen komme. Sowohl das Isoenzym-Muster der MDH, als auch die langsamere Wanderungs-Geschwindigkeit als die LDH-3 im elektrischen Feld konnte von uns bestätigt werden.

MADIWALE u. Mitarb. (1972,1 u.2) trennten die Isoenzyme mit Hilfe der Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel. Sie untersuchten Hämolysate (1+5 verdünnt) und Eluate von Blutflecken (Verdünnungsfaktor 10 bei Zugrundelegen der Frischblutmenge) von folgenden Tierarten: Kaninchen, Schaf, Ziege, Ochse und Büffel, und beschrieben eine hohe Zahl von Isoenzymbanden (Tab.6).

Spezies	Zahl der MDH-Isoenzymbanden	
	MADIWALE u. Mitarb. (1972,2)	Eigene Untersuchungen
Mensch	4	1
Kaninchen	3	1
Schaf	4	1(2)
Ziege	4	0
Ochse	4	1
Büffel	4	nicht untersucht

Tab.6 Zahl der MDH-Isoenzymbanden aus Blutspuren

Bei keiner der von uns untersuchten Tierarten konnte die von MADIWALE u. Mitarb. angegebene hohe Zahl von Isoenzymbanden bestätigt werden (Tab.6). Wir hatten zwar keine Bluthämolysate hergestellt, sondern nur Eluate aus

Vollblut, das auf Lappen getrocknet war, mit einer Konzentration von 1+4 und 1+8. Dennoch muß angenommen werden, daß in beiden Fällen hauptsächlich die erythrozytäre Form der MDH erfaßt wurde. Vielleicht sind die abweichenden Resultate durch die unterschiedlichen Techniken bedingt.

Die MDH zeigte bei unseren Untersuchungen wenig charakteristische Bandenmuster. Meistens bestand das Muster nur aus einer einzigen Bande. Im elektrischen Feld lief diese Bande relativ langsam (Elektrophorese-Dauer 90 min). Die Bandenorte einzelner Tierarten waren oft gar nicht oder nur um wenige Millimeter voneinander verschieden.

Dieses ungünstige Resultat bewog uns dazu, die Untersuchungen nicht fortzusetzen, da, jedenfalls mit dieser Technik, eine Artunterscheidung anhand des MDH-Isoenzymmusters nicht möglich war. Es wurden aus diesem Grunde auch keine Alterungsversuche vorgenommen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Eine von einer indischen Arbeitsgruppe mitgeteilte Methode wurde auf ihre Reproduzierbarkeit und Eignung für die rechtsmedizinische Praxis geprüft. Danach sollte die Blutart-Bestimmung an einer Blutspur (d.h. die Ermittlung der Spezies, durch die eine Spur verursacht wurde) außer mit herkömmlichen immunologischen Methoden auch durch die elektrophoretische Darstellung der Isoenzym-Muster der Laktatdehydrogenase (LDH), der Malatdehydrogenase (MDH) und der Peroxydase möglich sein.

Die Untersuchungen wurden im Gegensatz zu den Erstbeschreibern statt auf Polyacrylamid-Gel mit geringerem Zeit- und Arbeitsaufwand und besserer Differenzierung nach der von ASANO u. Mitarb. mitgeteilten Technik auf Celluloseacetat-Folien vorgenommen. Es wurden 127 künstliche Blutspuren von 22 verschiedenen, in unseren Breiten heimischen, Tierarten und 15 Menschenblutproben analysiert. Die Spuren wurden über einen Alterungszeitraum von 20 Wochen beobachtet.

Die Art-Unterscheidung gelingt sehr gut mit Hilfe der LDH-Muster. Lediglich Hundeblut stellt sich ähnlich wie Menschenblut dar. Ferner unterscheiden sich artverwandte Tiere - analog den Ergebnissen mit immunologischen Verfahren - nicht oder nur geringfügig. Die übrigen Spezies zeigten jedoch eine große Variationsbreite. Daher ist

die Blutart-Differenzierung mit Hilfe des LDH-Musters derjenigen durch spezifische Immun-Antiseren überlegen. Denn mit dieser Technik werden bei geringem Aufwand an Kosten, Arbeit und Zeit spezifische Hinweise zur Art-Diagnose gewonnen.

Auf weitere spurenkundliche Anwendungsbereiche des LDH-Musters (Nachweis von Sperma durch die charakteristische Bande LDH-X sowie Hinweis auf das Vorliegen von Leichen-, Menstruations- oder Plazentablut durch intensivere Anfärbung der Banden LDH-4 und LDH-5) wird im Rahmen der Literaturbesprechung hingewiesen. Die eigenen Befunde werden hinsichtlich der Technik, der Alterungseinflüsse sowie besonderer Charakteristika der Muster ausführlich beschrieben, durch Abbildungen belegt und durch Tabellen erläutert.

Die MDH-Analysen waren wider Erwarten unergiebig und können im Gegensatz zur LDH-Darstellung für die Praxis nicht empfohlen werden. Auf die Erprobung der Peroxydase-Muster wurde angesichts der - schon nach den Literaturdaten erkennbaren - guten Eignung der LDH verzichtet.

5. LITERATUR

ANANTHAKRISHNAN,R., WALTER,H.: Malatdehydrogenase, in: Becker,P.E., (Hrsg.), Humangenetik, Bd.I/3, Protein- und Enzymvarianten, Stuttgart (Thieme) 1975

ASANO,M., OYA,M. und HAYAKAWA,M.: Identification of menstrual blood stains by the electrophoretic pattern of lactate dehydrogenase isoenzymes. Forens.Sci.1, 327, 1972

BAUER,K.: Heterologe Reaktionen von Säugetierseren mit monospezifischen Antihumanseren. Humangenetik 7, 76, 1969

BLANCO,A. und ZINKHAM,W.: Lactate dehydrogenases in human testes. Science 139, 601, 1963

BOYER,S., FAINER,D. und WATSON-WILLIAMS,E.: Lactate dehydrogenase variant from human blood: evidence for molecular subunits. Science 141, 642, 1963

DAVIDSON,R., FILDES,R., GLEN-BOTT,A., HARRIS,H. und ROBSON,E.: Genetical studies on a variant of human lactate dehydrogenase (subunit A). Ann.hum.Genet. 29, 5, 1965

EISENBURG,I., KELLNER,E. und MUNTE,A.: Die LDH-Isoenzyme bei Virushepatitis. Fortschr.Med. 94, 675, 1976

GROBBELAAR,B., SKINNER,D. und GERTENBACH,VAN DE H.: The antihuman globulin inhibition test. J.forens. Med. 17, 103, 1970[1]

GROBBELAAR,B., SKINNER,D. und GERTENBACH,VAN DE H.: The serological differentation of human blood stains from those of sub-human primates in Southern Africa using the anti-globulin inhibition technique. J.forens.med. 17, 112, 1970[2]

HARTMANN,H. und OEPEN,I.: Zur unspezifischen Blutpräzipitation durch Serumproteine. Z. Immun.-Forsch. 142, 221, 1971

ISSELSTEIN,F.: Lactat-Dehydrogenase. Ärztl.Lab. 23, 21, 1977

LINCOLN,P.: Disclosing the bewitched by serological methods. Med.Sci.Law 15, 163, 1975

KITAMURA,M., IIJIMA,N., HASHIMOTO,F. und HIRATSUKA,A.: Hereditary deficiency subunit H of lactate dehydrogenase. Clin.chem.Acta 34, 419, 1971

KOWALEWSKI,S.: Die Isoenzyme der LDH. in: Weitzel,G. und Zöllner,N. (Hrsg.), Biochemie und Klinik, Monographien in zwangloser Folge. Stuttgart (Thieme) 1972

KOWALEWSKI,S.: Lactatdehydrogenase-Isoenzyme. Becker,P.E. (Hrsg.), Humangenetik, Bd.I/3 Protein- und Enzymvarianten. Stuttgart (Thieme) 1975

LEAKEY,T., COWARD,A., WARLOW,A. und MOURANT,A.: The distribution in human populations of electrophoretic variants of cytoplasmic malate dehydrogenase. Hum.Hered. 22, 542, 1972

MADIWALE,M. und MAHAL,H.: Zur Bestimmung der Artzugehörigkeit von Blutflecken bei forensischen Untersuchungen. Arch.Kriminol. 143, 87, 1969

MADIWALE,M. und MAHAL,H.: Schwierigkeiten beim Nachweis der Artzugehörigkeit an zersetzten Blutflecken. Arch.Kriminol. 146, 18, 1970

MADIWALE,M., MAHAL,H. und MASTER,R.: Isoenzyme der Lactat- und Malat-Dehydrogenase im Blut als Hilfsmittel für die Bestimmung der Artzugehörigkeit bei forensischen Untersuchungen. Arch.Kriminol. 150, 112, 1972[1]

MADIWALE,M., MAHAL,H. und MASTER,R.: Der Nachweis der Blutart in Blutspuren durch Isoenzymbestimmung. Arch.Kriminol. 150, 160, 1972[2]

MARKERT,C.: Epigenetic control of specific synthesis in Differentiating cells. in: Rudnick,D. (Ed.), Symposion of the Society for Study of Development and Growth. New York (Academic Press) 1963 b

MARKERT,C. und URSPRUNG,H.: Entwicklungsphysiologische Genetik, in: Grundlagen der modernen Genetik, Bd.10 Stuttgart (Fischer) 1974

MOKASHI,R. und MADIWALE,M.: Isoenzym-Methoden zur Unterscheidung von Menschen- und Affenblut. Arch.Kriminol. 153, 48, 1974

MOURANT,A., BECKMAN,L.,G., NILSSON,L. und TILLS,D.: Erythrocyte lactate dehydrogenase variants in the icelandic and swedish populations. Acta.genet. (Basel) 18, 553, 1968

NILSSON,L. und ERIKSSON,A.: Screening for haemoglobin and lactate dehydrogenase variants in the icelandic, swedish, finnish, lappish, Mari and Greenland eskimo populations. Hum.Hered. 22, 372, 1972

OEPEN,I., SCHMITT,R., SCHEIDT,U. und MERTENS,G.: LDH-Typenbestimmung an Blutspuren. Arch.Kriminol. 161, 106, 1978

RAABE,E.: Untersuchungen über die Blutartunterscheidung in Blutspuren an Hand des Esterasemusters. Diss. Marburg 1967

SCHLEYER,F. und OEPEN,I.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung, 2Lübeck (Schmidt-Römhild) 1977

SCHMIDT,K.,RITTER,H. und SCHMITT,I.: Differenzierung der leber- und herzspezifischen Lactatdehydrogenase im Serum. Ärztl.Lab. 22, 181, 1976

SCHMITT,R.: noch unveröffentlicht

SIVARAM,S., BHATNAGER,K., BRANDARI,S. und SIJHER,J.: Differentiation between stains of human blood and blood of monkey. Forens.Sci. 6, 145, 1973

STAFUNSKY,M.: Spurenkundliche Identifizierung von Fetal- und Neugeborenenblut mittels Alpha$_1$-Fetoprotein-Präzipitation in der Cellulose-Acetat-Folien-(CAF)-Elektrophorese. Diss. 1976

WIELAND,T. und PFLEIDERER,G.: Multiple Formen von Enzymen. Advanc.Enzymol. 25. 329, 1963

WIELAND,T., PFLEIDERER,G., HAUPT,I. und WÖRNER,W.: Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. IV.Biochem.Z. 332, 1, 1959

An erster Stelle möchte ich Frau Prof.Dr.med. Irmgard Oepen für die Überlassung des Themas, für ihre verständnisvolle Hilfe und Beratung bei der Niederschrift der Dissertation und besonders für ihre ständige Bereitschaft, auftretende Schwierigkeiten anzuhören und mit Rat und Tat auszuräumen, ganz herzlich danken.

Fräulein Gabriele Mertens danke ich sehr für die wertvollen Hinweise bei der Einarbeitung in die Technik und für die Anfertigung der Lichtbilder.

Für ihre freundliche und tatkräftige Hilfe bei der Beschaffung der Tierblutproben danke ich vielen Jägern im Marburger Landkreis, hier besonders Familie Scherer, den Mitarbeitern des Marburger Zentralschlachthofes, den Tierärzten Herrn Dr.med.vet. Möller und Herrn Dr. med.vet. Lemmer, den Mitarbeitern der Behringwerke Marburg, den Mitarbeitern des veterenärmedizinischen Fachbereiches der Justus-Liebig-Universität Gießen. Auch hier bin ich Fräulein Gabriele Mertens zu Dank verpflichtet.

Den Firmen Biotest und Molter danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung einiger Arbeitsmaterialien.

Lebenslauf

Am 6. August 1952 wurde ich als Älteste von fünf Kindern des Chefarztes Doz.Dr.med.habil. Rolf Scheidt und seiner Ehefrau Rosmari, geb. Bandel, in Marburg/Lahn geboren.
Seit 1953 lebte meine Familie in Ulm/Donau. Im November 1957 verstarb mein Vater.
Ich besuchte von 1959 an in Ulm drei Jahre lang die Volksschule. 1962 zogen wir wieder nach Marburg/Lahn, dort absolvierte ich das letzte Volksschuljahr. Anschließend besuchte ich das humanistische Gymnasium Philippinum und legte 1971 die Reifeprüfung ab.
Im Wintersemester 1971/72 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen und bestand nach dem Sommersemester 1972 das Vorphysikum, nach dem Wintersemester 1973/74 das Physikum. Anschliessend setzte ich mein Studium nach der neuen Approbationsordnung an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz fort. Im Frühjahr 1975 legte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab, im Sommer 1977 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Seit Oktober 1977 befinde ich mich im letzten Abschnitt der klinischen Ausbil - dung, dem Praktischen Jahr, das ich in Trier am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder verbringe. Im Oktober 1978 werde ich mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mein Medizinstudium beenden.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

in Tübingen: Arnold, Bentrup, Betz, Feneis, Flohé, Gieseler, Graumann, Grell, Guglielmie, Haselmann, Kemmler-Sack, Kissling, Mayer, Möricke, Nakel, Richter, Ritter, Sasse, Staudt, Stegmann, Stolz, Tölle, Weitzel, Weser.

in Mainz: Altwein, Baas, Borneff, Brost, Brunner, Brussatis, Buchwald, Busch, Diethelm, Distler, Dunges, Emmerich, Falke, Frey, Gärtner, Glatzel, Hadding, Halmágyi, Hill, Hochgesand, Hohenfellner, Hofmann, Jäckel, Just, Kahl, Kley, Knapstein, Koller, Korting, Krebs, Kümmerle, Langen, Löffelholz, Löhr, von Mengden, Muscholl, Ockenga, Otte, Prellwitz, Puls, Rathgen, Schiffer, Schölmerich, Schürmann, Theissing, Thönes.

in Trier: Bohnert, Böll, Cremer, Ganster, Guthy, Hennekeuser, Holling, Schneider, Teuteberg.